

STABLE SOLUTION OF REDUCED COENZYME Q

Publication number: JP2003026625

Publication date: 2003-01-29

Inventor: FUJII KENJI; KAWABE TAIZO; HOSOE KAZUNORI;
HIDAKA TAKAYOSHI

Applicant: KANEGAFUCHI CHEMICAL IND

Classification:

- international: (IPC1-7): C07C43/23; A23L1/30; A61K9/127;
A61K31/09; A61K47/24; A61K47/26; A61K47/28;
A61K47/44; C07C41/46; C07C46/10; C07C50/28;
C07F9/10; C09K15/08; C11B11/00; C11C3/00

- european:

Application number: JP20020129679 20020501

Priority number(s): JP20020129679 20020501; JP20010138340 20010509

Report a data error here

Abstract of JP2003026625

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a solution of a reduced coenzyme Q which is not used because of being easily oxidized and having hydrophobicity, capable of being put to a practical use because the solution is kept stable to the oxidation, and further to provide a method for preparing the composition and a method for preserving the composition. **SOLUTION:** This solution of the reduced coenzyme Q capable of being preserved for a long period in a cool state or at a room temperature is prepared by solubilizing the reduced coenzyme Q by coating the coenzyme Q with a liposome comprising a purified soybean lectin, or preparing a solubilized or emulsified solution of the reduced coenzyme Q by using a low-concentration surfactant and/or a fat and oil.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-26625
(P2003-26625A)

(43) 公開日 平成15年1月29日 (2003.1.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 0 7 C 43/23		C 0 7 C 43/23	D 4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/127		A 6 1 K 9/127	4 C 2 0 6
31/09		31/09	4 H 0 0 6
47/24		47/24	4 H 0 2 5
審査請求 未請求 請求項の数28 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-129679(P2002-129679)
(22) 出願日 平成14年5月1日(2002.5.1)
(31) 優先権主張番号 特願2001-138340(P2001-138340)
(32) 優先日 平成13年5月9日(2001.5.9)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000941
鎗淵化学工業株式会社
大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(72) 発明者 藤井 健志
兵庫県神戸市北区花山中尾台2-5-11
(72) 発明者 川辺 泰三
兵庫県姫路市飾磨区下野田1-7-203
(72) 発明者 細江 和典
兵庫県高砂市西畑3-8-17
(74) 代理人 100086586
弁理士 安富 康男 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 還元型補酵素Qの安定な溶液

(57) 【要約】

【課題】 酸化を受けやすいことと疎水性であることにより実用に供されてこなかった還元型補酵素Qについて、酸化に対して安定に維持できることにより、実用が可能である溶液の組成、作製方法および保存方法を提供する。

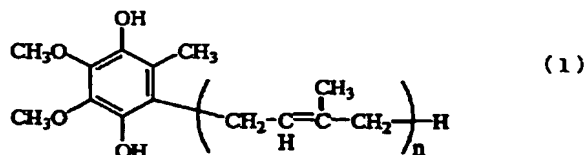
【解決手段】 還元型補酵素Qを精製大豆レシチンなどからなるリポソームで被覆し可溶化すること、あるいは還元型補酵素Qを低濃度の界面活性剤及び／又は油脂を用いて可溶化あるいは乳化した溶液を作製することにより、冷蔵あるいは室温にて長期間保存できる還元型補酵素Qの溶液を作製できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式(1)；

*【化1】

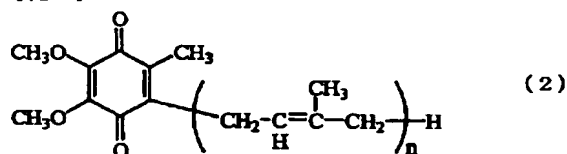
*



(式中、nは1～12の整数を表す)で表される還元型補酵素Qを含有する補酵素Qの溶液であって、補酵素Qをリボソームで被覆することによって還元型補酵素Qを酸化に対して安定に維持することを特徴とする補酵素Qの溶液。

【請求項2】 下記式(1)；

【化2】



(式中、nは1～12の整数を表す)で表される還元型補酵素Qを含有する補酵素Qの溶液であって、補酵素Qを界面活性剤及び／若しくは油脂、又は、リン脂質及び／若しくは糖脂質により可溶化若しくは乳化することによって還元型補酵素Qを酸化に対して安定に維持することを特徴とする補酵素Qの溶液。

【請求項3】 還元型補酵素Qを補酵素Q全量の20重量%以上含有する請求項1又は2記載の溶液。

【請求項4】 還元型補酵素Qを補酵素Q全量の40重量%以上含有する請求項1又は2記載の溶液。

【請求項5】 補酵素Qの濃度が0.0001～50重量%である請求項1又は2記載の溶液。

【請求項6】 補酵素Qが補酵素Q₁₀である請求項1又は2記載の溶液。

【請求項7】 リボソームがリン脂質及び／又は糖脂質を用いて調製されたものである請求項1記載の溶液。

【請求項8】 リン脂質がホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ジセチルリン酸、ステアシルアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトールアミン、カルジオリビン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール、または、これらの混合物である請求項7記載の溶液。

【請求項9】 リン脂質が精製大豆レシチンまたは卵黄レシチンである請求項7記載の溶液。

【請求項10】 糖脂質が、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド硫酸エステル、ガラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド硫酸エステル、ラ

クトシルセラミド、ガングリオシドG7、ガングリオシドG6、ガングリオシドG4、ジガラクトシルセラミド、または、これらの混合物である請求項7記載の溶液。

【請求項11】 リボソーム膜の構成成分としてステロールを含む請求項7記載の溶液。

【請求項12】 リン脂質及び／又は糖脂質を用いて乳化された乳化液である請求項2記載の溶液。

【請求項13】 リン脂質がホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ジセチルリン酸、ステアシルアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトールアミン、カルジオリビン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール、または、これらの混合物である請求項12記載の溶液。

【請求項14】 リン脂質が精製大豆レシチンまたは卵黄レシチンである請求項12記載の溶液。

【請求項15】 糖脂質が、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド硫酸エステル、ガラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド硫酸エステル、ラクトシルセラミド、ガングリオシドG7、ガングリオシドG6、ガングリオシドG4、ジガラクトシルセラミド、または、これらの混合物である請求項12記載の溶液。

【請求項16】 界面活性剤及び／又は油脂を用いて補酵素Qが可溶化もしくは乳化された請求項2記載の溶液。

【請求項17】 界面活性剤が、カルボン酸塩型アニオン界面活性剤、スルホン酸塩型アニオン界面活性剤、硫酸エステル塩型アニオン界面活性剤、リン酸エステル塩型アニオン界面活性剤、アミン塩型カチオン界面活性剤、四級アンモニウム塩型カチオン界面活性剤、アミノカルボン酸塩型両性界面活性剤、カルボキシベタイン型両性界面活性剤、硫酸エステル型両性界面活性剤、スルホン酸型両性界面活性剤、エーテル型非イオン界面活性剤、エーテルエステル型非イオン界面活性剤、エステル型非イオン界面活性剤、ブロックポリマー型非イオン界面活性剤、含窒素非イオン界面活性剤、天然界面活性剤、タンパク質加水分解物の誘導体である界面活性剤、高分子界面活性剤、チタン及びケイ素を含む界面活性剤、並びに、フッ化炭素系界面活性剤からなる群より選

択される少なくとも1つである請求項16記載の溶液。

【請求項18】 界面活性剤がポリソルベートまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である請求項17記載の溶液。

【請求項19】 油脂が、アボガド油、アーモンド油、ウイキョウ油、エゴマ油、オリーブ油、オレンジ油、オレンジラファ油、ゴマ油、カカオ油脂、カミツレ油、カロット油、キューカンバー油、牛脂、牛脂脂肪酸、ココナツ油、サフラワー油、ザクロ油、ザクロ脂肪酸、大豆油、ツバキ油、コーン油、ナタネ油、ハッカ油、パ
10 ーシック油、ヒマシ油、綿実油、落花生油、タートル油、ミンク油、卵黄油、カカオ油、バーム油、バーム核油、モクロウ、ヤシ油、豚脂、乳脂、及び、これら油脂類の水素添加物からなる群より選択される少なくとも1つである請求項16記載の溶液。

【請求項20】 油脂が、大豆油、コーン油及び／又はゴマ油である請求項19の溶液。

【請求項21】 界面活性剤の濃度が1重量%未満である請求項17記載の溶液。

【請求項22】 界面活性剤の濃度が1～20重量%で
20 ある請求項17記載の溶液。

【請求項23】 医療品、食品、食品用組成物、飲料、肥料、化粧品、飼料または抗酸化剤に用いられる請求項1～22のいずれかに記載の溶液。

【請求項24】 注射剤、補液、液剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、経口剤、皮膚用剤、頭皮用剤または保存溶液に用いられる請求項1～22のいずれかに記載の溶液。

【請求項25】 還元型補酵素Qをリン脂質及び／又は糖脂質から調製されるリボソームで被覆することを特徴とする、還元型補酵素Qの安定化方法。
30

【請求項26】 リン脂質が精製大豆レシチンである請求項25記載の方法。

【請求項27】 還元型補酵素Qを界面活性剤及び／又は油脂により可溶化若しくは乳化することを特徴とする、還元型補酵素Qの安定化方法。

【請求項28】 還元型補酵素Qをリン脂質及び／又は糖脂質により可溶化若しくは乳化することを特徴とする、還元型補酵素Qの安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、還元型補酵素Qを構成成分とする溶液に関し、特に還元型補酵素Qを酸化に対して安定に維持できる溶液に関する。

【0002】

【従来の技術】 補酵素Qは、細菌から哺乳動物まで広く生体に分布する必須成分であり、生体内の細胞中におけるミトコンドリアの電子伝達系構成成分として知られている。補酵素Qは、ミトコンドリア内において酸化と還元を繰り返すことで、電子伝達系における伝達成分とし
50

ての機能を担っているほか、還元型補酵素Qは抗酸化作用をもつことが知られている。ヒトでは、補酵素Qの側鎖が繰り返し構造を10個持つ、補酵素Q₁₀が主成分であり、生体内においては通常40～90%程度が還元型で存在している。補酵素Qの生理的作用としては、ミトコンドリア賦活作用によるエネルギー生産の活性化、心機能の活性化、細胞膜の安定化効果、抗酸化作用による細胞の保護効果などが挙げられている。

【0003】 補酵素Qは種々の用途での使用が知られており、例えば、酸化型補酵素Q₁₀はその心臓に対する効果から鬱血性心不全薬として用いられている。医薬用途以外でも、ビタミン類同様、栄養剤、栄養補助剤として経口的に使用されている。しかし、補酵素Qは脂溶性が強く水に溶けにくいいため、実際の用途は経口剤および皮膚用剤のみしか知られていなかった。

【0004】 近年、血中の酸化ストレスの増加による疾患の増悪が種々報告されるようになった。代表的なものとして、動脈硬化、糖尿病合併症などが挙げられる。これらの疾患では、血液中に存在する種々の酸化ストレスによる脂質変性などにより、疾患の発生あるいは増悪が起きている。このような酸化ストレスによる影響を減少させるためには抗酸化剤の投与による抗酸化能の賦活が有効である。脂質過酸化の抑制により有効であると考えられる脂溶性の抗酸化物質の代表的な化合物であるビタミンEは抗酸化物質として疾患の予防などに幅広く用いられている。近年、ビタミンEの抗酸化活性を充分に発揮させるためには還元型補酵素Q₁₀の共存が重要であることが報告され(Bowry等、1993、J. American Chemical Society、115、6029-6044)、脂溶性抗酸化物質としてビタミンEと共に、補酵素Qの重要性が明らかになりつつある。

【0005】 還元型補酵素Qはそれ自身でも強い抗酸化作用を持つため、可溶化して血中に充分量の還元型補酵素Qを送り込むことにより、血中の抗酸化活性を効果的に増加させることが可能となる。血中の抗酸化活性を増加させることは、虚血再還流時の血管障害、動脈硬化の再狭窄防止、脳梗塞後の血管障害の防止、動脈効果の予防、糖尿病の合併症の予防など活性酸素種によって増悪が示唆されている多くの疾患に対して幅広い有用性が考えられる。更に、新たな補給形態として点滴により体内へ送りこむことにより、経口による摂取ができない重症患者あるいは脳疾患患者への補酵素Qの供給が可能となる。このように補酵素Qを可溶化することは多くのメリットを生み出すことが予想される。

【0006】 補酵素Qには酸化型と還元型が知られており、酸化型補酵素Q₁₀。(ユビデカレノンまたはユビキノ)の可溶化方法に関しては従来から数多くの研究が行われてきた。酸化型補酵素Q₁₀の可溶化方法としては、リボソームによる被覆、界面活性剤あるいは油脂に

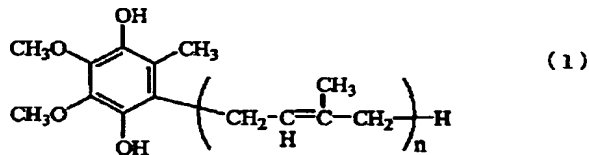
よる懸濁など種々の方法が報告されている（特開平5-186340号公報、特開平7-69874号公報、特表2000-510841号公報）が、実用に供された例は少ない。その理由のひとつとして、酸化型補酵素Q₁が抗酸化活性を示すためには還元酵素などによって還元型に変換される必要があるが、血中には還元酵素が存在しないため注射などによる投与では血中の酸化ストレスに対する抗酸化活性が期待できないことが挙げられる。一方、還元型補酵素Q₁はそれ自身が抗酸化活性を有することから、上記のような疾患に対する有用性が大いに期待できる物質ではあるが、酸化を受けやすく不安定であるという欠点があり実用には供しえなかった。還元型補酵素Q₁のリボソーム被覆体を酸化還元酵素などの研究のために作製したという研究報告はあるが（Kishi等、1999、BioFactors、10、131-138）、用いられているリボソームは実験毎の用時調製例であり、安定的に還元型補酵素Qを維持できる可溶化方法については全く知られていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、安定的に還元型補酵素Qを含有する水溶液を提供することを目的とするものである。

【0008】

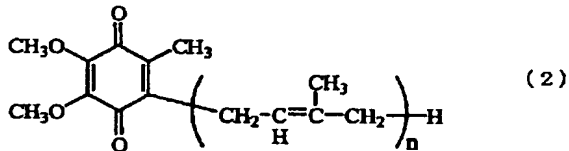
【課題を解決するための手段】本発明者等は上記の課題を克服するために研究を行った結果、還元型補酵素Qを*



【0011】（式中、nは1~12の整数を表す）および下記式（2）；

【0012】

【化4】



【0013】（式中、nは1~12の整数を表す）で表され、式（1）は還元型補酵素Qを表し、式（2）は酸化型補酵素Qを表す。

【0014】本発明で用いる補酵素Qは、式（1）で表される還元型補酵素Qを含有し、補酵素Q全量中、還元型補酵素Qを20重量%以上含有するのが好ましく、40重量%以上含有するのがより好ましい。上限は100重量%以下であればよく、好ましくは100重量%未満

* 安定に維持するために適した溶液の組成を見出し、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、還元型補酵素Qを含有する補酵素Qの溶液であって、還元型補酵素Qを酸化に対して安定に維持できるリボソーム溶液、あるいは界面活性剤及び／又は油脂による溶液または乳化液溶液である。本発明の溶液は、医療品、食品、食品用組成物、飲料、肥料、化粧品、飼料、または、抗酸化剤に用いることができる。医療品として、具体的には、注射剤、補液、液剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、経口剤、皮膚用剤、頭皮用剤、または、保存溶液に用いることができる。これらの医療品は、ヒトのほか、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ等の動物に用いることができる。また本発明は、還元型補酵素Qをリン脂質及び／又は糖脂質から調製されるリボソームで被覆することからなる還元型補酵素Qの安定化方法でもある。さらに本発明は、還元型補酵素Qを界面活性剤及び／又は油脂により可溶化若しくは乳化することからなる還元型補酵素Qの安定化方法でもある。さらに本発明は、還元型補酵素Qをリン脂質及び／又は糖脂質により可溶化若しくは乳化することを特徴とする、還元型補酵素Qの安定化方法でもある。以下で本発明を詳述する。

【0009】

【発明の実施の形態】補酵素Qは、下記式（1）；

【0010】

【化3】

であり、より好ましくは98重量%以下である。補酵素Q中の還元型補酵素Qの割合については、我々は、還元型補酵素Q₁を用いた経口組成物の投与による血中補酵素Q₁の増加効果は、還元型補酵素Q₁が20重量%以上含有された場合にみられ、40重量%以上含有された場合により強くなることを見出している（特開平10-109933号公報）。

【0015】上記還元型補酵素Qを得る方法としては特に限定されず、例えば、合成、発酵、天然物からの抽出等の従来公知の方法により補酵素Qを得た後、クロマトグラフィーにより流出液中の還元型補酵素Q区分を濃縮する方法などを採用することが出来る。この場合には、必要に応じて上記補酵素Qに対し、水素化ほう素ナトリウム、亜ジチオン酸ナトリウム（ヒドロサルファイトナトリウム）等の一般的な還元剤を添加し、常法により上記補酵素Qに含まれる酸化型補酵素Qを還元して還元型補酵素Qとした後にクロマトグラフィーによる濃縮を行っても良い。また、既存の高純度補酵素Qに上記還

元剤を作用させる方法によっても得ることが出来る。

【0016】本発明で使用できる補酵素Qは、前記式(1)および(2)で表されるように、側鎖の繰り返し単位(式中n)が1~12のものを使用することが出来るが、なかでも側鎖繰り返し単位が10のもの、すなわち補酵素Q₁₀が特に好適に使用できる。

【0017】本発明の溶液を得る方法としては特に限定されず、例えば、還元型補酵素Qを含有する補酵素Qを、適当な基剤を用いてリボソームで被覆し可溶化することにより得ることができる。あるいは、適当な界面活性剤及び/又は油脂によって可溶化もしくは乳化することによっても得ることができる。

【0018】リボソームの基剤として用いる脂質としては、リン脂質、糖脂質が好適に使用できる。

【0019】リン脂質としては、卵黄レシチン、精製大豆レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ジセチルリン酸、ステアリンアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトールアミン、カルジオリピン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール、およびこれらの混合物等の物質が使用できるが、ホスファチジルコリン含量が高いものが好ましく、精製大豆レシチンがより好適である。精製大豆レシチン中のホスファチジルコリン含量としては、0.01重量%以上が好ましく、0.1重量%以上がより好ましい。また、本発明の溶液にはホスファチジルコリンを別途添加することも、還元型補酵素Qの安定性の観点から好ましい。

【0020】糖脂質としてはジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド硫酸エステル、ガラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド硫酸エステル、ラクツシルセラミド、ガングリオシドG7、ガングリオシドG6、ガングリオシドG4、ジガラクトシルセラミド、およびこれらの混合物を用いることができる。

【0021】補酵素Qと、リン脂質または糖脂質の組成比については、補酵素Qの1モルに対して、通常、リン脂質または糖脂質が1モル以上存在すればよいが、10モル以上存在するのがより好ましい。それ以下でもよい。

【0022】なお、基剤にステロールを添加してもよい。添加量は、リン脂質あるいは糖脂質に対して1/5重量が好ましい量の上限であり、1/10重量が更に好ましい。ステロールとしては、コレステロールが最も好ましいが、その他のステロールを使用してもよい。

【0023】本発明の溶液における補酵素Qの含有量としては、溶液の用途にもよるが、好ましい量の下限は0.0001重量%であり、好ましい上限は50重量%である。より好ましい量の下限は0.001重量%であり、より好ましい量の上限は30重量%、さらに好まし

い量の下限は0.01重量%、さらに好ましい量の上限は15重量%である。

【0024】リボソームによる被覆は当業者周知の方法で行うことができ、例えば、クロロホルム、エタノール等の溶媒に溶解させた還元型補酵素Qとリン脂質の混合物を、溶媒を蒸発乾固させた後、適当な緩衝液中で超音波処理等によって分散させることにより調製することができる。上記操作は、一般的には還元型補酵素Qおよび脂質の酸化を抑えるため、窒素等の不活性ガス雰囲気下10に低温(例えば4℃)で行うのが好ましい。

【0025】次に、界面活性剤及び/又は油脂を用いた可溶化もしくは乳化について説明する。界面活性剤あるいは油脂は、一般に用いられている製品を使用することができる。例えば界面活性剤としては、カルボン酸塩型アニオン界面活性剤、スルホン酸塩型アニオン界面活性剤、硫酸エステル塩型アニオン界面活性剤、リン酸エステル塩型アニオン界面活性剤等のアニオン界面活性剤；アミン塩型カチオン界面活性剤、四級アンモニウム塩型カチオン界面活性剤等のカチオン界面活性剤；アミノカルボン酸塩型両性界面活性剤、カルボキシベタイン型両性界面活性剤、硫酸エステル型両性界面活性剤、スルホン酸型両性界面活性剤等の両性界面活性剤；エーテル型非イオン界面活性剤、エーテルエステル型非イオン界面活性剤、エステル型非イオン界面活性剤、ブロックポリマー型非イオン界面活性剤、含窒素非イオン界面活性剤等の非イオン界面活性剤；天然界面活性剤、タンパク質加水分解物の誘導体である界面活性剤、高分子界面活性剤、チタン及びケイ素を含む界面活性剤、並びに、フッ化炭素系界面活性剤等のその他の界面活性剤などを用いることができる。油脂としては、動物油脂、植物油等の天然油脂が挙げられ、具体的には、アボガド油、アーモンド油、ウイキョウ油、エゴマ油、オリーブ油、オレンジ油、オレンジラファ油、ゴマ油、カカオ油脂、カミツレ油、カロット油、キューカンバー油、牛脂、牛脂脂肪酸、ココナツ油、サフラワー油、ザクロ油、ザクロ脂肪酸、大豆油、ツバキ油、コーン油(トウモロコシ油)、ナタネ油、ハッカ油、パーシック油、ヒマシ油、綿実油、落花生油、タートル油、ミンク油、卵黄油、カカオ油、バーム油、バーム核油、モクロウ、ヤシ油、豚脂、乳脂、またはこれら油脂類の水素添加物(硬化油等)などを用いることができる。上記の油脂を乳化に使用する際の濃度としては、通常、0.01~40重量%である。

【0026】界面活性剤として、好ましくは、非イオン界面活性剤であり、より好ましくは、Tween80等のポリソルベート系界面活性剤やHCO60等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である。本発明の溶液における上記界面活性剤の濃度は、通常、0.01~20重量%であり、還元型補酵素Qの酸化防止の観点からは1重量%未満が好ましく、0.1重量%以下がさらに好まし

い。但し、界面活性剤溶液と還元型補酵素 Q_1 。粉末を別個にバックし、溶液を遇事調製して使用するなど保存による酸化を考慮しなくてよい場合、また、保存期間が非常に短期間である場合、あるいは気密容器中で脱酸素剤などを共存させて無酸素条件での保存を行う場合などでは、1重量%以上の界面活性剤による溶液或いは乳化液の作製は可能である。補酵素 Q の含有量は、先述のリボソームによる被覆の場合と同様である。

【0027】上記のようにして調製される溶液には、更に、薬剤学的に許容されている他の製剤素材を常法により適宜添加混合してもよい。添加しうる製剤素材としては特に限定されず、例えば、乳化剤、緊張化剤、緩衝剤、溶解補助剤、矯臭剤、防腐剤、安定化剤、抗酸化剤などが挙げられる。

【0028】本発明による溶液組成物の保存方法としては、特に限定されず、低温保存、密閉容器による嫌氣的保存、遮光保存などを用いることができる。

【0029】上記のようにして調製される本発明の溶液は、冷蔵あるいは室温で保存した際に、還元型補酵素 Q を酸化に対して安定に維持することができる。ここでいう「安定に維持できる」とは、溶液の用途と目的によっても異なるが、例えば、還元型補酵素 Q の残存率が保存開始時の濃度の80%以上であることを表す。この割合を維持できる期間としては、1週間以上が好ましく、更に好ましくは1ヶ月以上、もっとも好ましくは1年間以上である。

【0030】本発明による還元型補酵素 Q を含有する溶液は、医療用、化粧品用、食品用、園芸用、酪農用など広い範囲で使用できる。具体的な形態としては注射剤、輸液、液剤、点眼剤、内服液剤、ローション剤、ヘヤートニック、化粧品乳液、スプレー液、エアロゾル、ドリンク液、液体肥料、保存用溶液などが挙げられ、医療用としては更に臓器移植時の保存用溶液などとして用いることも出来る。更に、上記の形態は動物、魚介類用として用いてもよく、飼料として用いてもよい。また、抗酸化溶液として肉、魚など生鮮食品の保存用に用いることもできる。

【0031】

【実施例】以下に実施例及び調製例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例および調製例のみに限定されるものではない。

【0032】（実施例1）還元型補酵素 Q_1 。含有リボソーム中の還元型補酵素 Q_1 。の酸化安定性に対するレシチンの影響

レシチンとして卵黄レシチン（和光純薬工業製）および精製大豆レシチンであるレシノールS10およびレシノールS10EX（日本ケミカルズ製）を用いた。レシノールS10はホスファチジルコリン含量が25~30重量%であるのに対し、レシノールS10EXはホスファチジルコリンが95重量%以上の含量である。これらの

レシチンを用い、以下のようにして、還元型補酵素 Q_1 。含有リボソームを作製した。即ち、補酵素 Q_1 。(酸化型：還元型=5：95（重量比）)のエタノール溶液（1mg/ml）にレシチンのクロロホルム溶液（3.2mg/ml）を加え、共に溶解させた。エバポレーターにて溶媒を完全に減圧除去した後、HEPES緩衝液（50mM、pH7.4）を加え、振盪することにより脂質フィルムを分散させ乳白色の懸濁液を作製した。窒素気流下、30分間、4℃で超音波処理することでリボソームを作製し、遠心で巨大分子を除去した。操作中の還元型補酵素 Q_1 。の酸化を防ぐため、これらの操作は出来る限り迅速に行った。

【0033】リボソーム中の還元型補酵素 Q_1 。の酸化安定性をHPLCにて評価した。作製直後の、0.05%還元型補酵素 Q_1 。含有リボソーム中の還元型補酵素 Q_1 。の比率は、卵黄レシチンでは約90重量%、精製大豆レシチン（レシノールS10、レシノールS10EX）では約95重量%であり、卵黄レシチンではリボソーム作製時に若干の酸化を受けるが、精製大豆レシチンでは、リボソーム作製時に殆ど酸化を受けないことが判った。

【0034】これらのリボソームを空气中で保存した時の保存温度による還元型補酵素 Q_1 。の酸化への影響を調べた。その結果を図1~3に示した。値は、 $n=2$ の平均値である。

【0035】冷蔵条件（4℃）、30日保存では、全てのレシチンで作製したリボソームにおいて、還元型補酵素 Q_1 。は90%以上維持されていたが、保存60日後では、レシノールS10およびレシノールS10EXで作製したリボソームでは、還元型補酵素 Q_1 。は殆ど酸化されなかったが、卵黄レシチンを用いたリボソームでは約25%が酸化を受けていた（図1）。

【0036】23℃で保存したリボソームでは、保存30日後では、レシノールS10およびレシノールS10EXで作製したリボソームでは、90%以上が還元型で維持されており、卵黄レシチンによるリボソームでも80%以上が還元型で維持されていた。しかし、保存60日後においては、レシノールS10では還元型補酵素 Q_1 。が90%以上残存していたが、レシノールS10EXでは約35%が、卵黄レシチンでは約55%が酸化を受けていた（図2）。

【0037】40℃の加温条件では、卵黄レシチンは21日後に殆どが酸化を受けた。また、レシノールS10では保存2週間後には約半分が低下し、30日後には還元型補酵素 Q_1 。の残存量は約20%であった。レシノールS10EXを用いたリボソームでは、30日後でも約70%が還元型として残存していた（図3）。

【0038】以上の結果、卵黄レシチンに比較して、精製大豆レシチンであるレシノールが還元型補酵素 Q_1 。リボソームの基剤としてより適している事が明らかにな

った。精製大豆レシチンの中でも、ホスファチジルコリン含量が高いレシノールS10EXが40℃でより安定であったが、25℃では、レシノールS10がより有用性が高く、用いる製品の保存条件により、これらの精製大豆レシチンを使い分けることでより安定な保存期間を得ることが出来る。また、長期保存が必要な用途では、精製大豆レシチン、特にホスファチジルコリン含量が高いものが基剤として優れているが、短期的な保存でよい場合には、卵黄レシチンでリボソームを作製することも可能である。

【0039】(実施例3)還元型補酵素Q₁₀の界面活性剤による可溶化溶液の安定性

還元型補酵素Q₁₀の界面活性剤による溶液を以下の方法にて作製し、保存下での酸化安定性を評価した。界面活性剤として、ポリソルベート80(Tween80)あるいはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(HCO60)を用い、それぞれの1重量%あるいは0.1重量%水溶液を作製した。これらの溶液に還元型補酵素Q₁₀を終濃度0.05重量%になるように加えて溶液とした。この溶液の23℃、空气中保存での還元型補酵素Q₁₀の酸化安定性に対する界面活性剤濃度の影響を図4に示した。値はn=2の平均値である。還元型補酵素Q₁₀の酸化安定性は、界面活性剤の濃度に強く影響され、低濃度で作製した溶液がより安定性が高いことが明らかになった。本試験の結果、界面活性剤濃度が0.1重量%であれば、還元型補酵素Q₁₀は、23℃保存で約1ヶ月は安定に保存できることが判った。しかし、界面活性剤濃度が1重量%であった場合には、1週間は安定に保存できたが、その後、急速に酸化を受けることが判った。従って、界面活性剤で溶液あるいは乳化液を作製する場合は、使用する界面活性剤の濃度を低くすることで、より保存期間の長い溶液が作製できる。1重量%以上の界面活性剤での溶液あるいは乳化液は、用事調製、短期間の保存、あるいは完全な嫌気条件での密閉などの条件を課することにより利用することができる。

【0040】(実施例4)還元型補酵素Q₁₀の安定性に対する油脂の影響

還元型補酵素Q₁₀と油脂をそれぞれ60℃に加熱し、溶解した還元型補酵素Q₁₀を油脂に混合することで、還元型補酵素Q₁₀の1重量%油脂溶液を作製した。作製した溶液を、空気下、40℃で保存し、保存中の還元型補酵素Q₁₀の残存率をHPLCにて定量した。その結果を図5に示した。今回評価した6種類の油脂のうち、コーン油、大豆油、ゴマ油は、強い安定化作用を示し、サフラワー油、オリーブ油、ヒマシ油の安定化効果は弱いことが判った。

【0041】(調製例1)注射剤

精製大豆レシチン	0.3重量%
エタノール	6.5重量%
マクロゴール400	5.0重量%

ソルビトール	4.5重量%
還元型補酵素Q	0.1重量%
注射用蒸留水	100.0重量%に

【0042】(調製例2)乳化液

大豆油	10.0重量%
グリセリン	2.5重量%
ホスファチジルコリン	1.2重量%
還元型補酵素Q	0.1重量%
精製水	100.0重量%に

10 【0043】(調製例3)乳化液

Tween80	1.0重量%
グリセリン	12.5重量%
ホスファチジルコリン	1.2重量%
還元型補酵素Q ₁₀	0.1重量%
精製水	100.0重量%に

【0044】(調製例4)化粧水

精製大豆レシチン	0.2重量%
スクワラン	0.1重量%
エタノール	14.0重量%
グリセリン	4.0重量%
還元型補酵素Q	0.1重量%
精製水	100.0重量%に

【0045】

【発明の効果】本発明により抗酸化物質あるいは栄養補助成分として有用性の高い還元型補酵素Qの液剤を供給できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】3種類のレシチンにより作製したリボソーム中の還元型補酵素Q₁₀の、4℃での酸化安定性を示したグラフである。縦軸は作製時に対する還元型補酵素Q₁₀の残存率を%で表し、横軸は保存日数を表す。値はn=2の平均値である。

【図2】3種類のレシチンにより作製したリボソーム中の還元型補酵素Q₁₀の、23℃での酸化安定性を示したグラフである。縦軸は作製時に対する還元型補酵素Q₁₀の残存率を%で表し、横軸は保存日数を表す。値はn=2の平均値である。

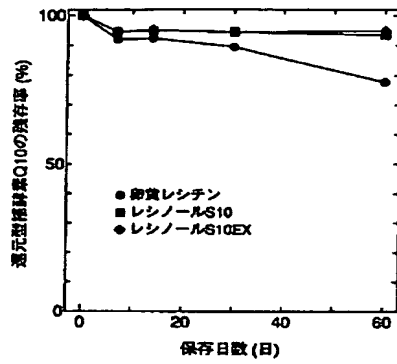
【図3】3種類のレシチンにより作製したリボソーム中の還元型補酵素Q₁₀の、40℃での酸化安定性を示したグラフである。縦軸は作製時に対する還元型補酵素Q₁₀の残存率を%で表し、横軸は保存日数を表す。値はn=2の平均値である。

【図4】2種類の界面活性剤による還元型補酵素Q₁₀溶液の23℃での酸化安定性に対する界面活性剤濃度の影響を示したグラフである。縦軸は作製時に対する還元型補酵素Q₁₀の残存量を示し、横軸は保存日数を表す。値はn=2の平均値である。

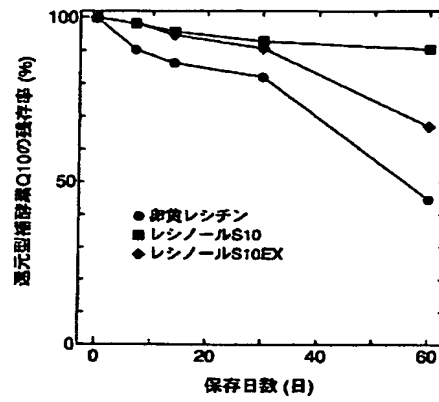
【図5】6種類の油脂による還元型補酵素Q₁₀溶液の40℃での酸化安定性を示したグラフである。縦軸は作製時に対する還元型補酵素Q₁₀の残存量を示し、横軸

は保存日数を表す。値はn = 2の平均値である。

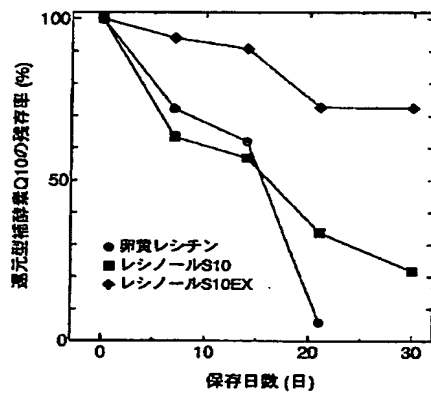
【図1】



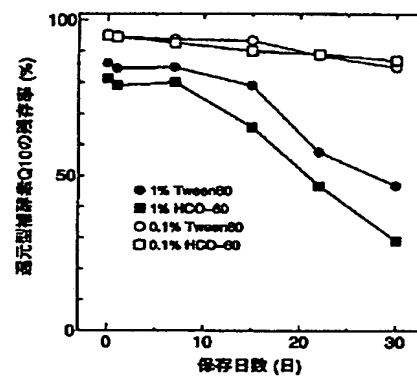
【図2】



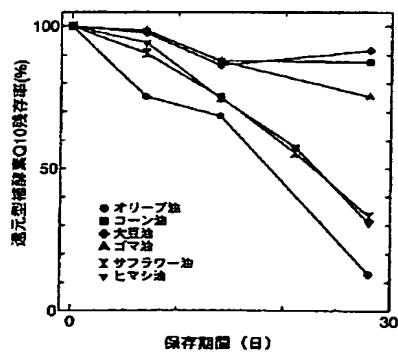
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

キーワード(参考)

A 6 1 K 47/26

A 6 1 K 47/26

4 H 0 5 0

47/28

47/28

4 H 0 5 9

47/44

47/44

C 0 7 C 41/46

C 0 7 C 41/46

46/10

46/10

50/28

50/28

C 0 7 F 9/10

C 0 7 F 9/10

A

C 0 9 K 15/08

C 0 9 K 15/08

C 1 1 B 11/00

C 1 1 B 11/00

C 1 1 C 3/00

C 1 1 C 3/00

(72)発明者 日高 隆義

F ターム(参考) 4B018 LB08 MD08 ME06

兵庫県神戸市垂水区本多間2-21-8

4C076 AA11 BB01 BB11 BB24 BB25

BB26 BB31 CC21 CC26 DD03

DD04 DD05 DD06 DD07 DD13

DD14 DD17 DD19 DD35 DD63

DD64 DD66 DD70 EE01 EE41

EE53 EE54 EE55 EE58 FF51

FF63

4C206 AA02 CA34 KA01 MA03 MA05

MA24 MA26 MA28 MA29 MA36

MA72 MA78 MA79 MA83 MA86

NA03 ZA36 ZB21 ZC21

4H006 AA03 AB10 AB12 AB20 AB83

AD30 AD40 BB31 GP03

4H025 AA16 AA19 AC01 AC04 AC06

AC07 BA01

4H050 AA03 AB83

4H059 BA34 BA83 BB02 BB03 BC03

BC13 BC48 DA24 EA03 EA11